

# PCT WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/22, C07K 14/565, A61K 38/21

A1

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/48018

29. Oktober 1998 (29.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/02238

(22) Internationales Anmeldedatum:

16. April 1998 (16.04.98)

(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

197 17 864.2

23. April 1997 (23.04.97)

DE

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUN-HOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHNEIDER-FRESENIUS, Christian [DE/DE]; Rembrandtstrasse 5, D-30177 Hannover (DE), OTTO, Bernd [DE/DE]; Halberstadtweg 9, D-30659 Hannover (DE). WASCHÜTZA, Gero [DE/DE]; Höfen 8, D-38536 Meinersen (DE).
- (74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).

(54) Title: RECOMBINANT HUMAN BETA INTERFERON WITH ENHANCED SOLUBILITY

(54) Bezeichnung: HUMANES, REKOMBINANTES INTERFERON- $\beta$  MIT VERBESSERTER LÖSLICHKEIT

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn 165

#### (57) Abstract

invention relates variants of recombinant human beta interferon and to a method for the production thereof, wherein at least one of the following amino acids Leu (5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Leu(106), Phe(50), Phe(111), Leu(116), Leu(120) and Phe(156) are exchanged with hydrophilic amino acid with a hydroxy group, specially serine, tyrosine or threonine, resulting in enhanced hydrophilic property of the protein surface.

#### (57) Zusammenfassung

Varianten rekombinanten Interferon- $\beta$  sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung vorgeschlagen, bei denen mindestens eine der folgenden Aminosäuren Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120) sowie Phe (156) gegen hydrophile Aminosäuren mit einer Hydroxygruppe, insbesonders Serin, Tyrosin oder Threonin, ausgetauscht sind, wodurch die Hydrophilität der Oberfläche des Proteins erhöht wird.

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu 20 25 30Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Xaa Gln 35 40 45Gin Xaa Gin Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gin 50 55 60 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn 70 75 80 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn 85 90 95 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Xaa Glu Lys Glu Asp Xaa Thr  $100 \hspace{1cm} 105 \hspace{1cm} 101 \hspace{1cm}$ Arg Gly Lys Xaa Met Ser Ser Xaa His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg 115 120 125Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr 130 135 140 lle Val Arg Val Glu Ile Xaa Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu 145 150 160

Met Ser Tyr Asn Xaa Leu Gly Xaa Leu Gl<br/>n Arg Ser Ser Asn Xaa Gl<br/>n 1 10 15

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Osterreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
ВЈ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL.	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PΤ	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	Li	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dānemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

1

# Humanes, rekombinantes Interferon-β mit verbesserter Löslichkeit

Die Erfindung betrifft Varianten des humanen, rekombinanten Interferon- $\beta$  mit verbesserter Löslichkeit.

Interferon- $\beta$  ist ein regulatorisches Protein, das durch Rezeptorbindung zur Aktivierung von Genen führt. Dadurch werden in der Zelle antivirale, antiproliferative sowie weitere biologische Aktivitäten vermittelt.

Interferone gehören, wie die Interleukine, zur Klasse der Cytokine und gliedern sich in unterschiedliche Klassen:

Interferon Typ I  $(-\alpha, -\beta, -\omega, -\tau)$  und Typ II  $(-\gamma)$ 

Humanes Interferon- $\beta$  ist ein Protein mit einem Moleku-largewicht von 22 kDa und 166 Aminosäure-Resten. Es

2

wird hauptsächlich in Fibroblasten bei Virusbefall gebildet und besitzt antivirale, antiproliferative sowie weitere biologische Aktivitäten. Die Aminosäuresequenz des humanen Interfernon- $\beta$  wurde erstmals von Taniguchi et al. (1980), Gene Bd. 10, Seiten 11 bis 15, veröffentlicht und ist in Fig. 1 dargestellt.

Gentechnologisch erzeugtes Interferon- $\beta$  aus Bakterien-oder Säugerzellen wird erfolgreich bei der Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt, einer bislang unheilbaren Krankheit mit großem Patientenkollektiv. Als problematisch für die Produktion und Aufarbeitung des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  erweist sich jedoch die sehr hohe Hydrophobizität des Proteins, die eine sehr schlechte Löslichkeit des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  verursacht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Varianten des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  zur Verfügung zu stellen, deren Löslichkeit in polaren Medien wie beispielsweise wässrigen Flüssigkeiten verbessert ist. Weiterhin ist es Ziel dieser Erfindung, Herstellungsverfahren für und Möglichkeiten der Verwendung von Varianten des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  mit erhöhter Löslichkeit in polaren Medien wie wässrigen Flüssigkeiten anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch das rekombinante humane Interferon- $\beta$  gemäß Anspruch 1, seine Verwendung gemäß Anspruch 5 sowie seine Herstellung gemäß Anspruch 6 oder 7 gelöst.

Gemäß Anspruch 1 wird in dem bekannten humanen Interferon- $\beta$  mindestens eine der folgenden zehn hydrophoben Aminosäuren gegen eine hydrophile Aminosäure aus-

5

10

15

20

25

30

35

3

getauscht: Leu 5, Phe 8, Phe 15, Leu 47, Phe 50, Leu 106, Phe 111, Leu 116, Leu 120 oder Phe 156. Die Erfindung bezieht sich dabei auf die Einzelmutationen sowie alle möglichen Kombinationen dieser einzelnen Aminosäuren-Austausche.

Die genannten Aminosäuren liegen im wesentlichen an der Oberfläche des humanen Interferon- $\beta$  und nehmen dort einen relativ großen Anteil der Oberfläche ein. Der Austausch dieser Aminosäuren führt daher zu einer überproportional großen Verbesserung des hydrophilen Charakters der Oberfläche des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  und erhöht daher die Löslichkeit dieses Proteins in polaren Medien wie zum Beispiel wässrigen Flüssigkeiten. Das erfindungsgemäße rekombinante humane Interferon- $\beta$  ist aufgrund seiner erhöhten Hydrophilität in der Produktion sowie in der Aufarbeitung zu einem Wirkstoff erheblich einfacher handzuhaben.

Die Produktion der erfindungsgemäßen Varianten des rekombinanten humanen Interferon-ß erfolgt in allgemein bekannter, herkömmlicher Weise mit Hilfe von Mikroorganismen beispielsweise in einer mit dem Gen für eines der erfindungsgemäßen Proteine versehenen Escherichia coli - Kultur. Die Herstellung dieser gentechnisch veränderten Mikroorganismen erfolgt ebenfalls in allgemein bekannter Weise mit Hilfe klassischer gentechnischer Mutageneseverfahren zum Austausch der entsprechenden Aminosäuren gegen hydrophile Aminosäuren, auf deren Darstellung an dieser Stelle daher verzichtet wird.

Die erfindungsgemäßen Proteine finden Anwendung zur Herstellung von Arzneimitteln, beispielsweise gegen Multiple Sklerose, sowie als Feinchemikalie für In

5

15

20

25

4

vitro-Versuche oder für Interferonspiegelmessungen. Die verbesserte Hydrophilität dieser Proteine vereinfacht dabei sowohl die Herstellung, den Transport, die Aufbewahrung als auch die Applikation als Arzneimittel oder Feinchemikalie.

Vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Proteine werden in den abhängigen Ansprüchen gegeben.

Besonders vorteilhaft ist der Austausch gegen die Aminosäuren Serin, Tyrosin und Threonin, die mit je einer Hydroxygruppe besonders hydrophil sind.

Serin eignet sich aufgrund seiner geringen Größe besonders für einen Austausch, da mit ihm besonders geringe sterische Änderungen des Proteins verbunden sind.

In Fig. 2 ist die Aminosäuresequenz des nativen rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  dargestellt, bei dem die obengenannten zehn Aminosäuren wahlweise gegen Serin ausgetauscht werden. Diese austauschbaren Aminosäuren sind als Xaa dargestellt. Werden diese Aminosäuren ausgetauscht, so wird die Hydrophilität der Oberfläche des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$ sehr stark verbessert, während lediglich geringe Beeinträchtigungen der Funktionalität und Wirksamkeit des humanen rekombinanten Interferon- $\beta$  auftreten.

Eine besonders vorteilhafte Weiterbildung ist in Fig. 3 dargestellt, wobei hier sämtliche der obengenannten zehn Aminosäuren gegen Serin ausgetauscht wurden, so daß sich eine besonders starke Erhöhung der Hydrophilität der Oberfläche des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  ergibt.

5

Im folgenden wird ein Beispiel für eine erfindungsgemäße Variante des humanen rekombinanten Interferon-ß gegeben:

5 Fig. 1 zeigt das native humane rekombinante Interferon- $\beta$ ,

10

20

25

30

- Fig. 2 zeigt die erfindungsgemäßen Variantendes rekombinanten humanen Interferon-  $\beta$ ,
- Fig. 3 zeigt ein erfindungsgemäßes rekombinantes humanes Interferon- $\beta$ , und
- 15 Fig. 4 zeigt Primer für die Mutagenese für die Herstellung erfindungsgemäßen Interferon- $\beta$ .

Wie bereits oben beschrieben, ist in Fig. 1 das native humane rekombinante Interferon- $\beta$  beschrieben, wie es bereits jetzt mit Hilfe der bekannten molekularbiologischen und biotechnischen Möglichkeiten hergestellt werden kann.

In Fig. 2 ist die Sequenz des nativen humanen rekombinanten Interferon- $\beta$  dargestellt, wobei mit Xaa diejenigen Aminosäuren bezeichnet wurden, die gegen eine Aminosäure mit mindestens einer Hydroxygruppe, vorteilhafterweise gegen Serin, Tyrosin und/oder Threonin ausgetauscht werden können und dabei ein erfindungsgemäßes rekombinantes humanes Interferon- $\beta$  ergeben, das eine erhöhte Oberflächenhydrophilität besitzt.

6

Beispielsweise wurden sämtliche zehn Einzelvarianten des Interferon- $\beta$ , bei denen Leu (5), Phe (8), Phe (15), Leu (47), Phe (50), Leu (106), Phe (111), Leu (116), Leu (120) oder Phe (156) gegen Serin ausgetauscht wurde, hergestellt, wobei sich insbesondere die Varianten mit dem Austausch der Aminosäuren Leu (5), Phe (8), Leu (47), Phe (50), Leu (106), Phe (111), Leu (116), Leu (120) gegenüber dem nativen Interferon- $\beta$ , sowie auch diese Varianten der Cys-17-Ser-Variante des humanen Interferon- $\beta$  durch eine vergleichbare biologische Aktivität auszeichnen.

Fig. 3 zeigt ein Beispiel für ein humanes rekombinantes Interferon- $\beta$ , bei dem die folgenden Aminosäuren gegen Serin ausgetauscht wurden:

Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120) sowie Phe(156). Bei dieser Variante des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  ergibt sich eine besonders hohe Hydrophilität der Oberfläche des Proteins und damit eine besonders gute Löslichkeit in wässrigen Lösungen.

Beispielsweise zeigt auch die Mehrfachvariante mit Aminosäureaustauschen an den Positionen 47, 50, 106, 111, 116 und 120 eine dem in diesem Beispiel verwendeten Ausgangsprotein Interferon- $\beta$  mit einem Cys17Ser-Austausch entsprechende Aktivität.

Die Herstellung von Organismen mit einem erfindungsgemäß veränderten Gen für humanes rekombinantes Interferon- $\beta$  erfolgt mittels klassischer Mutagenese-Verfahren.

7

Die Mutagenese erfolgt mittels PCR (Polymerasekettenreaktion). Die Mutationen werden durch synthetische Oligonukleotide eingeführt. Als Templat dient Plasmid-DNA mit dem IFN-β-Gen. Bei der hier angewandten PCR-Methode wird das gesamte Plasmid vervielfältigt. Die Selektion der PCR-Fragmente erfolgt durch einen Restriktionsverdau des gesamten PCR-Ansatzes mit dem Enzym DpnI. Dieses Enzym erkennt nur methylierte Schnittstellen. Da in-vitro durch PCR erzeugte Fragmente unmethyliert sind, wird durch DpnI nur die Templat-DNA abgebaut. Im Erfolgsfall bleibt nach dem DpnI-Verdau ein Fragment von der Länge des linearisierten Templates übrig, das die Mutationen trägt. Die erzeugten PCR-Fragmente werden kloniert und sequenziert.

PCR-Ansatz	(100	$\mu$ l):Templat-DNA	10 µg
		Primer	je 100 pmol
		Nukleotidmix	200 $\mu$ M je dNTP
		MgSO <sub>4</sub>	2-6 mM
		DNA-Polymerase	2,5 Units
PCR-Protoko	11	Dauer	Temperatur
Schrit	t 1.	4 min	95°C
Schrit	t 2.	+Enzym	
Schrit	t 3.	45 sec	95°C
Schrit	t 4.	1 min	55°C
Schrit	t 5.	10 min	68°C
			goto 3. (11x)
Schrit	t 6.	10 min	68°C
Schrit	t 7.		4 ° C

Die PCR wurde auf einem Thermocycler PTC-200 (Fa MJ Research) durchgeführt.

8

Für jede PCR sind zwei Primer notwendig, ein "forward"und ein "reverse"-Primer. Beide Primer schließen sich direkt aneinander an, binden aber an jeweils unterschiedlichen Strängen und mit entgegengesetzter Orientierung.

In Fig. 4 sind Primer dargestellt, die für die Mutagenese verwendet wurden, damit im Genprodukt, dem erfindungsgemäßen Interferon- $\beta$ , die linksseitig benannte Aminosäure(n) gegen Serin ausgetauscht sind.

Die letzten beiden Primer enthalten als einzige "reverse"-Primer Mutationen. Eine PCR mit diesen Primern führt zusätzlich Mutationen ein, ohne die zuvor eingefügten Mutationen 5/8 bzw. 106/111 wieder aufzuheben. Wird das Wildtypgen als Templat genommen, lassen sich mit den "reverse"-Primern vier Mutationen auf einmal einführen (5-17 bzw. 106-120).

#### SEQUENZPROTOKOLL

- (1) ALLGEMEINE ANGABEN:
  - (i) ANMELDER:
    - (A) NAME: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e. V.
    - (B) STRASSE: Leonrodstrasse 54
    - (C) ORT: München
    - (D) BUNDESLAND: Freistaat Bayern
    - (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
    - (F) POSTLEITZAHL: 80636
  - (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Humanes rekombinantes Interferon-beta mit verbesserter Löslichkeit
  - (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 22
    - (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
      - (A) DATENTRÄGER: Diskette
      - (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS (D) SOFTWARE: Patentin (EPA)
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:
  - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 166 Aminosäuren(B) ART: Aminosäure

    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
    - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
      - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
      - (G) ZELLTYP: Fibroblast

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met Ser Tyr Asn Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln 1 10 15

Cys Gln Lys Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu 20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln 35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln 50 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn 65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn 85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg 115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr 130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn 165

PCT/EP98/02238

11

#### (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 166 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
  - (G) ZELLTYP: Fibroblast
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
    (B) LAGE: 5

  - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal

  - (B) LAGE: 8
    (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
  - (B) LAGE: 15
  - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
  - (B) LAGE: 47
  - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
  - (B) LAGE: 50
  - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal

  - (B) LAGE: 106
    (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
  - (B) LAGE: 111
  - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Phe, Ser, Tyr oder Thr
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
  - (B) LAGE: 116
  - (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

#### (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 120
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

#### (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: spezielles Merkmal
- (B) LAGE: 151
- (C) SONSTIGE ANGABEN: /NOTE= Xaa ist Leu, Ser, Tyr oder Thr

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Tyr Asn Xaa Leu Gly Xaa Leu Gln Arg Ser Ser Asn Xaa Gln

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Xaa Gln 40

Gln Xaa Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Xaa Glu Lys Glu Asp Xaa Thr

Arg Gly Lys Xaa Met Ser Ser Xaa His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr 135

Ile Val Arg Val Glu Ile Xaa Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu 145

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn 165

#### (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 166 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens(G) ZELLTYP: Fibroblast
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:
- Met Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Ser Leu Gln Arg Ser Ser Asn Ser Gln
- Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
- Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Ser Gln
- Gln Ser Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
- Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
- Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
- His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Ser Glu Lys Glu Asp Ser Thr
- Arg Gly Lys Ser Met Ser Ser Ser His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
- Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
- Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Ser Ile Asn Arg Leu 150 155

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

14

(2) ANGABEN ZU SE (i) SEQUENZK: (A) LÄN	Q ID NO: 4 ENNZEICHEN: GE: 25 Basenpaare : Nucleinsäure	
C) STR	ANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOP	OLOGIE: Linear	
(ii) ART DES	MOLEKÜLS: DNA	
(xi) SEQUENZ	BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:	
C TCC CTT GGA TTC	CTA CAA AGA AGC	25
(2) ANGABEN ZU SE	Q ID NO: 5	
(i) SEQUENZK	ENNZEICHEN:	
(A) LAN	GE: 25 Basenpaare	
(B) ART	: Nucleinsäure ANGFORM: Einzelstrang	
(U) TOR	OLOGIE: Linear	
(ii) ART DES	MOLEKÜLS: DNA	
(xi) SEQUENZ	BESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:	
•		<b>-</b> -
C TTG CTT GGA TCC	CTA CAA AGA AGC	25
(2) ANGABEN ZU SE		
(i) SEQUENZK	ENNZEICHEN:	
	GE: 28 Basenpaare	
	: Nucleinsäure	
	ANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOP	POLOGIE: Linear	
(11) ART DES	: MOLEKÜLS: DNA BESCHREIBUNG:SEQ ID NO:6:	
(XI) SEQUENZ	BEBCHREIDONG. DIQ ID NO. O.	
AGC AGC AAT TCT C	TAG TCC CAG AAG CTC C	28
(2) ANGABEN ZU SE	EQ ID NO: 7	
(i) SEQUENZE	KENNZEICHEN:	
	NGE: 28 Basenpaare	
	T: Nucleinsäure	
	RANGFORM: Einzelstrang	
(ii) NOT DES	POLOGIE: Linear S MOLEKÜLS: DNA	
	ZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:7:	
, ,		
AGC AGC AAT TTT C	CAG TCC CAG AAG CTC C	28
(2) ANGABEN ZU SI		
	KENNZEICHEN:	
	NGE: 27 Basenpaare	
(B) AR	F: Nucleinsäure RANGFORM: Einzelstrang	
(D) TO	POLOGIE: Linear	
	S MOLEKÜLS: DNA	
	ZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:	
TT AAG CAG TCC C	AG CAG TTC CAG AAG G	27

WO 98	8/48018
-------	---------

#### PCT/EP98/02238

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9  (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  (A) LÄNGE: 27 Basenpaare  (B) ART: Nucleinsäure  (C) STRANGFORM: Einzelstrang  (D) TOPOLOGIE: Linear  (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA  (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:	
TT AAG CAG CTG CAG CAG TCC CAG AAG G	27
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LÄNGE: 30 Basenpaare (B) ART: Nucleinsäure (C) STRANGFORM: Einzelstrang (D) TOPOLOGIE: Linear (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:	
GAA GAA AAA TCC GAG AAA GAA GAT TTC ACC	30
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11  (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  (A) LÄNGE: 30 Basenpaare  (B) ART: Nucleinsäure  (C) STRANGFORM: Einzelstrang  (D) TOPOLOGIE: Linear  (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA  (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:	
GAA GAA AAA CTG GAG AAA GAA GAT TCC ACC	30
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12  (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  (A) LÄNGE: 25 Basenpaare  (B) ART: Nucleinsäure  (C) STRANGFORM: Einzelstrang  (D) TOPOLOGIE: Linear  (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA  (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:12:	
A AAA TCC ATG AGC AGT CTG CAC CTG	25
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13  (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  (A) LÄNGE: 25 Basenpaare  (B) ART: Nucleinsäure  (C) STRANGFORM: Einzelstrang  (D) TOPOLOGIE: Linear  (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA  (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:13:	
A AAA CTC ATG AGC AGT TCC CAC CTG	25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14 (i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LÄNGE: 28 Basenpaare	
(B) ART: Nucleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: Linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:	
AC TTT TAC TCC ATT AAC AGA CTT ACA GG	28
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 25 Basenpaare	
(B) ART: Nucleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: Linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:	
IT GTA GCT CAT ATG TAA GTA TTT CC	25
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare	
(B) ART: Nucleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: Linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:	
TCT TTG TAG GAA TCC AAG CAA GTT GTA GC	29
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare	
(B) ART: Nucleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: Linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:	
T CTC CTC AGG GAT GTC AAA GTT CAT CC	27
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare	
(B) ART: Nucleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: Linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:	
CAS CAS MET COM CAS AME COM TAT COM	27

17

(2)	ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19 (i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LÄNGE: 23 Basenpaare (B) ART: Nucleinsäure	
	(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
	(D) TOPOLOGIE: Linear	
	<pre>(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:19:</pre>	
	(XI) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:	
CC	CCT GGT GAA ATC TTC TTT CTC	23
(2)	ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20	
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
	(A) LÄNGE: 27 Basenpaare	
	(B) ART: Nucleinsäure	
	(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
	(D) TOPOLOGIE: Linear	
	(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA	
	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:	
r T	CT TAG GAT TTC CAC TCT GAC TAT GG	27
(2)	ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21	
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
	(A) LÄNGE: 29 Basenpaare	
	(B) ART: Nucleinsäure	
	(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
	(D) TOPOLOGIE: Linear	
	(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA	
	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:	
TCT	TTG TAG GGA TCC AAG GGA GTT GTA GC	29
(2)	ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22	
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
	(A) LÄNGE: 26 Basenpaare	
	(B) ART: Nucleinsäure	
	(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
	(D) TOPOLOGIE: Linear	
	(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA	
	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:	
cc c	CCT GGT GGA ATC TTC TTT CTC GGA	26

## Patentansprüche

- 1. Humanes, rekombinantes Interferon-ß,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
  daß mindestens eine der Aminosäuren Leu(5),
  Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106),
  Phe(111), Leu(116), Leu(120), Phe(156) gegen
  Aminosäuren mit mindestens einer Hydroxy-Gruppe
  ausgetauscht ist.
- 10 2. Interferon- $\beta$  nach Anspruch 1, dadurch gekenn-zeichnet, daß die Aminosäuren mit Hydroxygruppen Serin, Tyrosin und/oder Threonin sind.
- 15 3. Interferon-ß nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Aminosäuresequenz enthält:

_	Met 1	Ser	Tyr	Asn.	Xaa S	Leu	Gly	Xaa	Leu	Gln 10	Arg	Ser	Ser	Asn	Xaa 15	Gln
5	Cys	Gln	Lys	Leu 20	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn 25	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr 30	Суѕ	Leu
	Lys	Asp	Arg 35	Met	Asn	Phe	Asp	Ile 40	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys 45	Gln	Xaa	Gln
10	Gln	Xaa 50	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala 55	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr 60	Glu	Met	Leu	Gln
15	Asn 65	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe 70	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser 75	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn 80
13	Glu	Thr	Ile	Val	Glu 85	Asn	Leu	Leu	Ala	Asn 90	Val	Tyr	His	Gln	Ile 95	Asn
20	His	Leu	Lys	Thr 100	Val	Leu	Glu	Glu	Lys 105	Xaa	Glu	Lys	Glu	Asp 110	Xaa	Thr
	Arg	Gly	Lys 115	Xaa	Met	Ser	Ser	Xaa 120	His	Leu	Lys	Arg	Tyr 125	Tyr	Gly	Arg
25	Ile	Leu 130	His	Tyr	Leu	Lys	Ala 135	Lys	Glu	Tyr	Ser	His 140	Cys	Ala	Trp	Thr
30	Ile 145	Val	Arg	Val	Glu	Ile 150	Leu	Arg	Asn	Phe	Tyr 155	Xaa	īle	Asn	Arg	Leu 160
	Thr	Gly	Tyr	Leu	Arg 165	Asn										
	wob	ei :	zumi	.nde	st e	eine	od	er 1	mehr	ere	dei	- An	ino	säur	cen	
35	Xaa	(5)	, Xa	a (8	),	Xaa(	15)	, X	aa (4	7),	Xaa	a (50	),	Xaa	(106	),
	Xaa	(11	1),	Xaa	(11	5),	Xaa	(12	0),	Xaa	(156	5),	Ser	in,	Tyr	0-
			_	her	oni	n si	nd	und	für	di	e ar	nder	en	Amir	nosä	u-
		gi				·•-										
4.0				Le												
40	хаа	(15	) 15	t P	ne,	хаа	(47	) 1:	st I	.eu,						

Xaa(50) ist Phe, Xaa(106) ist Leu, Xaa(111) ist Phe, Xaa(116) ist Leu, Xaa(120) ist Leu, Xaa(156) ist Phe.

- Interferon-B nach mindestens einem der vorher-4. 5 gehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgende Aminosäuresequenz enthält:
- Met Ser Tyr Asn Ser Leu Gly Ser Leu Gln Arg Ser Ser Asn Ser Gln 10 10
  - Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu 25
- Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Ser Gln 40 15
  - Gln Ser Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln 5.5
- Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn 20 75 70 65
  - Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn 90 85
- 25 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Ser Glu Lys Glu Asp Ser Thr 105 100
- Arg Gly Lys Ser Met Ser Ser Ser His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg 120 125 115 30
  - Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr 130
- Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Ser Ile Asn Arg Leu 35 155 150 145

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn 165

5

10

15

20

WO 98/48018 PCT/EP98/02238

5. Verwendung von Interferon-ß nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels, als Feinchemikalie für invitro-Versuche oder für Interferonspiegelmessungen.

- Herstellungsverfahren für ein humanes, rekombi-6. nantes Interferon- $\beta$  nach Anspruch 1 unter Verwendung eines Mikroorganismus, der das Gen für rekombinantes humanes Interferon-ß enthält, dadurch gekenn zeich net, daß in ansonsten bekannter Weise in dem Gen für humanes, rekombinantes Interferon- $\beta$  des Organismus der genetische Code für mindestens eine der Aminosäuren Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120), Phe(156) gegen einen genetischen Code für Aminosäuren mit mindestens einer Hydroxygruppe, vorzugsweise Serin, Tyrosin oder Threonin, ausgetauscht wird.
- Herstellungsverfahren für ein humanes, rekombinantes Interferon- $\beta$  nach Anspruch 1 unter Verwendung eines Mikroorganismus, 25 dadurch gekenn zeich net, daß in ansonsten bekannter Weise in das genetische Material des Mikroorganismus das Gen für humanes, rekombinantes Interferon- $\beta$  eingefügt wird, wobei der genetische Code für mindestens 30 eine der Aminosäuren Leu(5), Phe(8), Phe(15), Leu(47), Phe(50), Leu(106), Phe(111), Leu(116), Leu(120), Phe(156) des eingefügten Gens gegen einen genetischen Code für Aminosäuren mit mindestens einer Hydroxygruppe, vorzugsweise Serin, Tyrosin oder Threonin, ausgetauscht ist. 35

1.5	5 -CT <u>CC</u> CTTGGATTCCTACAAAGAAGC-3	25
F8	5 ^-CTTGCTTGGAT <u>C</u> CCTACAAAGAAGC-3 ^	25
F15/C17	5 - AGCAGCAATTCTCAGTCCCAGAAGCTCC-3 ^	28
C17	5 - AGCAGCAATTTTCAGT <u>CC</u> CAGAAGCTCC-3 '	28
L47	5´-TTAAGCAG <u>TCC</u> CAGCAGTTCCAGAAGG-3´	27
F50	5 ^-TTAAGCAGCTGCAGCAGTCCCAGAAGG-3 ^	27
L106	5´-GAAGAAAAA <u>TCC</u> GAGAAAGAAGATTTCACC-3´	30
F111	5´-GAAGAAAACTGGAGAAAGAAGATTCCACC-3´	30
L116	5 ^-AAAA <u>TC</u> CATGAGCAGTCTGCACCTG-3 ^	25
L120	5´-AAAACTCATGAGCAGT <u>TCC</u> CACCTG-3´	25
F156	5´-ACTTTTACT <u>C</u> CATTAACAGACTTACAGG-3´	28
L5/F3Rev	5 '-TTGTAGCTCATATGTAAGTATTTCC-3 '	25
F15/C17Rev	5 '-TCTTTGTAGGAATCCAAGCAAGTTGTAGC-3 '	29
L47/F50Rev	5 '-TCTCCTCAGGGATGTCAAAGTTCATCC-3 '	27
L106/F111Rev	-5 ^-CAGGACTGTCTTCAGATGGTTTATCTG-3 ^	27
L116/L120Rev	-5 ^-CCCCTGGTGAAATCTTCTTCTC-3 ^	23
F156Rev	5'-TTCTTAGGATTTCCACTCTGACTATGG-3'	27
L5-C17Rev´	5 - TCTTTGTAGG <u>G</u> ATCCAAG <u>G</u> GAGTTGTAGC-3 -	29
1.106-1.1208es	7'5'-CCCCTGGTGGAATCTTCTTTCTCGGA-3'	26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 98/02238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/22 C07K14/565 A61K38/	21
According to International Patent Classification(IPC) or to both national classific	cation and IPC
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification system followed by classificated LPC $6-C07K-C12N$	( symbols)
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that	such documents are included in the fields searched
Electronic data base consulted during the international search (name of data b	pase and, where practical, search terms used)
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category Citation of document, with indication, where appropriate, of the re	elevant passages Relevant to claim No.
A EP 0 163 993 A (G.D. SEARLE & CO 11 December 1985 see page 9, line 8 - line 10 see page 16, line 8 see page 37	D., LTD.) 1
Further documents are listed in the continuation of box C.	Palent lamily members are lieled in annex.
Special categories of cited documents:  "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  "E" earlier document but published on or after the international filling date  "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  "P" document published prior to the international filling date but later than the priority date claimed  Date of the actual completion of the international search	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  "8" document member of the same patent family  Date of mailing of the international search report
29 July 1998	07/08/1998
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  NL - 2280 HV Rijswljk  Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  Fav. (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Le Cornec, N

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

PCT/EP 98/02238

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date	
EP 163993	Α	11-12-1985	AU	589560 B	19-10-1989	
			AU	4256185 A	28-11-1985	
			JP	610 <b>56200 A</b>	20-03-1986	
			US	4914033 A	03-04-1990	
			US	4769233 A	06-09-1988	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/FP 98/02238

		F	C1/Er 90/02230
A. KLASSIF IPK 6	C12N15/22 C07K14/565 A61K38/21		
Nach der inte	ernationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassif	kation und der IPK	
	CHIERTE GEBIETE		
Recherchiert IPK 6	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole C07K C12N	)	
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sowe	eit diese unter die recherc	hierten Gebiete tallen
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Nar	ne der Datenbank und e	vti. verwendete Suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>3</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe o	der in Betracht kommend	en Teile Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 163 993 A (G.D. SEARLE & CO., 11. Dezember 1985 siehe Seite 9, Zeile 8 - Zeile 10 siehe Seite 16, Zeile 8	1	
	siehe Seite 37		
Wei	ttere Veroffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu nehmen	X Siehe Anhang P	atentiamille
° Besonder *A" Veröffe aber	re Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	oder dem Prioritätsda Anmeldung nicht koll	ing, die nach deminternationalen Anmeldedatum atum veröffentlicht worden ist und mit der idlert, sondem nur zum Verständnis des der egenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden
Anme	entlichung, die gegignet ist, einen Prioritätsanspruch zweitelhaft er-	kann allein aufgrund	pesonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf
schei ande soll d	inen zu lassen, oder durch die das Verörtenlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden i oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	Y* Veröffentlichung von kann nicht als auf en	eit beruhend betrachtet werden besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung indenscher Tätigkeit beruhend betrachtet pröffentlichung mit einer oder mehreren anderen
*O* Veröff eine	eführt) tentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht entlichung, die vor dem internationalen Anmerkedatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	Veröffentlichungen d diese Verbindung fü	ieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und einen Fachmann nahellegend ist Mitglied derselben Patentfamilie ist
	s Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des	nternationalen Recherchenberichts
	29. Juli 1998	07/08/19	98
Name und	i Postanschrift der Internationalen Recherchenbehorde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Be	diensteter
	NI 2280 HV Rijswlik Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+91-70) 340-3016	Le Corne	ec, N

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

Im Recherchenbericht angeführtes Patentookument	Datum der verofientlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 163993 A	11-12-1985	AU 589560 B AU 4256185 A JP 61056200 A US 4914033 A US 4769233 A	19-10-1989 28-11-1985 20-03-1986 03-04-1990 06-09-1988

			,
; 			